



中华人民共和国国家标准

GB/T 17999.5—2008
代替 GB/T 17999.4—1999

SPF 鸡 微生物学监测 第 5 部分: SPF 鸡 琼脂扩散试验

SPF chicken—Microbiological surveillance—
Part 5: Agar gel precipitation test for SPF chicken

2008-12-31 发布

2009-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

GB/T 17999《SPF 鸡 微生物学监测》分为 10 个部分：

- 第 1 部分：SPF 鸡 微生物学监测总则；
- 第 2 部分：SPF 鸡 红细胞凝集抑制试验；
- 第 3 部分：SPF 鸡 血清中和试验；
- 第 4 部分：SPF 鸡 血清平板凝集试验；
- 第 5 部分：SPF 鸡 琼脂扩散试验；
- 第 6 部分：SPF 鸡 酶联免疫吸附试验；
- 第 7 部分：SPF 鸡 胚敏感试验；
- 第 8 部分：SPF 鸡 鸡白痢沙门氏菌检验；
- 第 9 部分：SPF 鸡 试管凝集试验；
- 第 10 部分：SPF 鸡 间接免疫荧光试验。

本部分为 GB/T 17999 的第 5 部分。

本部分修订参照了 GB/T 18936—2003《高致病性禽流感诊断技术》、NY/T 540—2002《鸡病毒性关节炎琼脂凝胶免疫扩散试验方法》、NY/T 556—2002《鸡传染性喉气管炎诊断技术》、OIE《陆生动物（哺乳动物、禽鸟和蜜蜂）诊断试验和疫苗手册》（第五版）中的有关规定。

本部分代替 GB/T 17999.4—1999《SPF 鸡 琼脂扩散试验》。

本部分与 GB/T 17999.4—1999 相比主要变化如下：

- 增加了加样示意图、结果判定示意图以示说明；
- 增加了附录 A“马立克氏病病毒抗原琼脂扩散检验的程序”；
- 增加了附录 B“试剂的配制”。

本部分的附录 A、附录 B 为规范性附录。

本部分由中华人民共和国农业部提出。

本部分由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本部分起草单位：中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、中国动物卫生与流行病学中心、济南斯帕法斯家禽有限公司。

本部分主要起草人：曲连东、姜骞、韩凌霞、邵卫星、朱果、单忠芳、刘家森、司昌德、郭东春、于海波、孟庆文。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB/T 17999.4—1999。

SPF 鸡 微生物学监测

第 5 部分:SPF 鸡 琼脂扩散试验

1 范围

GB/T 17999 的本部分规定了琼脂扩散试验的技术要求。

本部分适用于对 SPF 鸡进行以下病原微生物的血清抗体检测:禽流感病毒(Avian Influenza Virus)、传染性支气管炎病毒(Infectious Bronchitis Virus)、传染性法氏囊病病毒(Infectious Bursa Disease Virus)、传染性喉气管炎病毒(Infectious Laryngotracheitis Virus)、禽痘病毒(Fowl Pox Virus)、禽脑脊髓炎病毒(Avian Encephalomyelitis Virus)、网状内皮增生症病毒(Reticuloendotheliosis Virus)、禽呼肠孤病毒(病毒性关节炎)(Avian Reovirus)、马立克氏病病毒(Marek's Disease Virus)、禽腺病毒 I 群(Avian Adenovirus Group I)、多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)。本部分同样适用于对 SPF 鸡进行马立克氏病病毒(Marek's Disease Virus)抗原的检测(见附录 A)。

2 原理

抗原、抗体在含有电解质的琼脂凝胶中,可以向四周自由扩散,二者互相结合,在最适比例处出现沉淀线。采用已知抗原检测相应的抗体,或已知抗体鉴定相应的抗原。

3 试剂和材料

3.1 试剂

- 3.1.1 琼扩抗原或抗体。
- 3.1.2 标准阳性血清。
- 3.1.3 被检血清或羽髓。
- 3.1.4 0.01 mol/L、pH7.2 的 8%氯化钠磷酸盐缓冲溶液(见附录 B)。
- 3.1.5 0.01 mol/L、pH6.4 的 8%氯化钠磷酸盐缓冲溶液(检测禽流感病毒抗体时使用,见附录 B)。
- 3.1.6 优质琼脂粉或琼脂糖。

3.2 材料

琼扩板,打孔器,移液器。

4 操作程序

4.1 琼脂板制备

将 1 g 优质琼脂粉或 0.8 g~1.0 g 琼脂糖加入 100 mL 的 0.01 mol/L、pH7.2 的 8%氯化钠磷酸缓冲液中(检测禽流感病毒抗体时使用),水浴加热融化,稍凉(60 ℃~65 ℃),倒入琼扩板内(厚度为 3 mm),待琼脂凝固后,4 ℃冰箱保存备用。

4.2 打孔

用打孔器在琼脂板上按 7 孔梅花图案打孔,孔径 3 mm~4 mm,孔距 3 mm。用 8 号针头挑出孔内琼脂,挑出时从孔一侧边缘插入针头,轻轻移动,等空气进入孔底后,再向上挑出。

4.3 封底

用酒精灯轻烤平皿底部至微融化,以防侧漏。

4.4 加样

用移液器吸取抗原悬液,滴入中间孔(图 1 中的⑦号孔),周围①、④号孔加阳性血清,其余孔加被检